培養基組成份對康乃馨試管苗玻璃質化的影響[1]

古新梅　蔡新聲[2]

摘要：利用康乃馨組織培養所繁殖的枝條，探討培養基組成份造成試管苗玻璃質化的影響，結果顯示在不同的洋菜種類及濃度條件下，以液體培養的康乃馨玻璃質化最嚴重，其次為水晶洋菜 (gelrite)，其餘則依洋菜 (Difco agar) 濃度的增加，而玻璃質化的程度漸減。在 cytokinins 的比較試驗中發現，玻璃質化的比例隨 BA (6-benzylamino purine) 的濃度增高而增加，kinetin (6-furfurylamino purine) 亦有相同的趨勢，但結果較 BA 不明顯。氨態氮與硝酸態氮的比例試驗中發現，隨著氨態氮比例的增加而玻璃質化有增高的趨勢。綜合以上結果顯示含有0.9% Difco-agar、0.5 ppm BA、NO_3^-：NH_4^+=1：1～2：1及3% sucrose 之1/2 Murashige & Skoog 基本鹽類之培養基，可大量繁殖康乃馨並避免嚴重的玻璃質化。玻璃質化枝條之外觀具水浸狀肉質莖葉，而組織切片則顯示莖部特化組織較正常者不分化，皮層及髓部薄壁細胞排列較不整齊，葉肉較正常者缺乏柵狀組織及海綿組織之分化，其間有大且空的細胞。

關鍵詞：康乃馨、組織培養、玻璃質化、組織切片。

玻璃質化 (vitrification，glassification，glassiness or hyperhydric transformation) 是植物組織培養過程中試管苗極為常見的現象(7)，由於這些玻璃質化的試管苗移植土壤時存活率極低(8)，因此這種不正常的試管苗對組織培養的商業化，十分不利。

許多報告報導了組織培養玻璃質化形成原因，例如液態培養基(8)、無機養份如 NH_4^+的超適濃度 (superoptimal concentrations) (20)、高濃度的 cytokinins(3,4,6)、低濃度的洋菜(7,11,21)、試管中高的相對濕度(23)、osmotic shock(10)及品種(5)等。

本研究以改變培養基的洋菜，cytokinin 的種類及濃度，及培養基中氨態氮與硝酸態氮的比例，探討康乃馨試管苗玻璃質化情形，並配合組織切片之觀察，俾有助於了解玻璃質化形成之原因，以期能進一步解決玻璃質化對組織培養試管苗所造成的嚴重損失。

材料和方法

一、材　料

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第1705號。
2. 本所農藝系助理及研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

本試驗所選用之材料，係採自田間康乃馨（*Dianthus caryophyllus* L. cv. *opale*）植株上之生長點及腋芽經接種於固體培養基中，每支試管含有 10ml 之培養基（表面積約20cm^2），接種兩個腋芽或一個生長點，經數週培養成幼苗，並經數次繼代培養繁殖足量作爲試驗材料。

二、培養基成分及培養材料

接種康乃馨芽體培養基以 MS（Murashige & Skoog，1962）[15]爲基本配方，其中鐵鹽及有機成份均維持全量，其餘無機成份則改爲半量，再添加 0.5ppm BA，3％蔗糖及0.9%洋菜（Difco agar），pH 調至5.7±0.1（簡稱 CN 培養基），以121°C、15 lb/in^2（1.05 kg/cm^2）之高溫高壓殺菌後，放冷備用。

培養基成份之測試則以上述 CN 培養基爲主，依試驗項目之不同而改變其組成分，其中洋菜試驗以 0 、0.6、0.9、1.2、1.5%之 Difco agar 及0.25% Gelrite 來比較其玻璃質化的情形；cytokinins 以 0 、0.5、1 、2 、4ppm 的 BA 及 0 、1 、2 、4 、8ppm 的 kinetin 來作比較；硝酸態氮與氨態氮之比例則以1：2、1：1、2：1、4：1、8：1及16：1的處理，來比較其玻璃質化的情形。試驗用培養容器爲 500ml 三角瓶，含 100ml 培養基，其內接種四株康乃馨的幼苗。接種後置於25±1°C之恆溫，以每日16小時照光（固體培養約 2,000 lux，液體培養約 300 lux）培養；另液體培養則將材料置於迴轉式振盪器上，以 100rpm 之轉速振盪培養之。

培養數週後，觀察並記錄各試驗之玻璃質化情形，玻璃質化枝條之判別係以肉眼觀察，葉片呈水浸透明狀爲準，並取已玻璃質化的部份，以石蠟切片法製成永久片觀察比較之。製作石蠟切片之方法如下：材料以 FAA 固定，經 TBA 脫水滲蠟包埋等步驟後，以轉動式切片機切取 10μ 厚之連續蠟帶，再用 Haupts adhesive 黏著於載玻片上，經 safranin 及 fast green 染色製成永久片[1,2]。

上述各試驗中每個處理含40個重覆，將觀察所得之數據取其平均值並計算已玻璃質化枝條所佔比率及標準偏差，以 Sigma Plot 之電腦程式繪出圖形，比較處理間之差異；形成枝條則以 Duncan's multiple range test 測定處理間之差異。

結　果

一、不同種類的洋菜及濃度之影響

圖 1 顯示康乃馨經30天培養，所形成枝條之玻璃質化程度在液體培養基中可達100%，固體培養中，0.25% Gelrite 達55%、0.6% agar 爲40%，而0.9、1.2及1.5% agar 三者玻璃質化的枝條比例均極低，由此得知隨著洋菜濃度的增加，其玻璃質化的條枝比例逐漸減少。經60天培養後枝條之玻璃質化程度與30天所調查之結果相同，故圖 1 係以30天之結果繪製；表 1 則係康乃馨莖頂培養於不同洋菜培養基中，30天後形成許多枝條之結果，顯示液體培養最有利於形成枝條及大量繁殖，隨洋菜濃度的提高繁殖數漸減，0.25% Gelrite 之培養基形成枝條數比 Difco agar 佳，幾乎和液體培養相當，但玻璃質化的程度也以 Gelrite及液體培養者最嚴重。

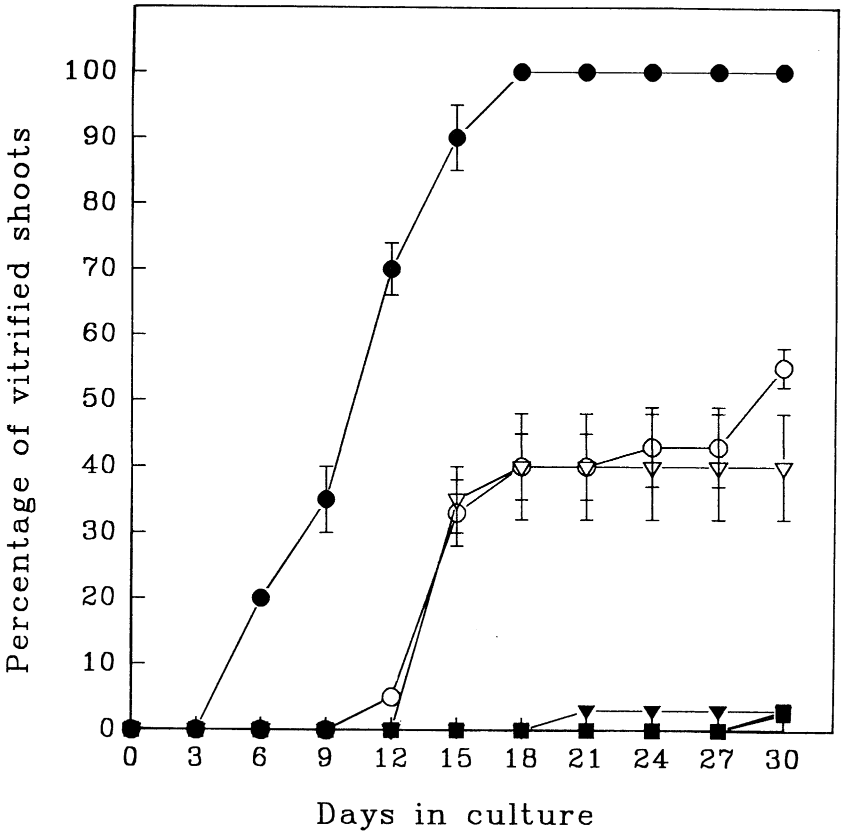

Fig. 1. Percentage of vitrification of carnation cultured in medium containing different sources and concentrations of agar.
●Difco agar 0% ; ▽Difco agar 0.6% ;
▼Difco agar 0.9% ; □Difco agar 1.2% (overlapping with■) ;
■Difco agar 1.5% ; ○Gelrite 0.25%

表 1. 不同濃度及種類的洋菜對康乃馨莖頂培養形成枝條的影響

Table 1. Effect of agar concentration on shoot production of carnation shoot tip culture.

Basal medium with agar* (%)	No. of explants cultured	Average no. of adventitious shoots produced
0.0	40	10.5[a]**
0.6	40	8.1[b]
0.9	40	7.9[b]
1.2	40	4.3[c]
1.5	40	4.0[c]
with gerlite		
0.25	40	10.0[a]

* Basal medium : MS basic salts supplemented with 3% sucrose and 0.5 ppm BA, pH=5.7. Culture duration was 30 days. The percentage of vitrified shoots was shown in Fig. 1.

** Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level using Duncan's multiple range test.

二、不同 Cytokinins 之影響

在 BA 的試驗中發現康乃馨培養至第60天時，4ppm BA 之玻璃質化枝條百分比爲46%、2 ppm 爲23%、1ppm 爲20%、0.5ppm 爲 7 %，而不含 BA 的培養基沒有玻璃質化枝條產生（圖 2），由此得知隨著 BA 濃度的減少，其玻璃質化枝條的比例漸減，而表 2 則係康乃馨莖頂培養於不同濃度 BA 培養基中，30天後形成枝條之結果，顯示隨 BA 濃度增高枝條數漸增的趨勢；而含 kinetin 的培養基中也發現，枝條之玻璃質化情形亦隨著 kinetin 濃度的減少而漸減（圖 3），但情況不若 BA 嚴重，例如 8ppm kinetin 時之玻璃質化枝條只有19%、4ppm 爲15%而 2ppm 以下更降至 5 %以下，顯示 kinetin 對康乃馨試管苗枝條之玻璃質化影響較 BA 小；表 3 雖然呈現隨濃度增高枝條數漸增的趨勢，但即使提高至 8mg/l 之 kinetin 亦只有5.6個枝條形成，顯示 kinetin 對康乃馨莖頂培養形成枝條之效率不如 BA。

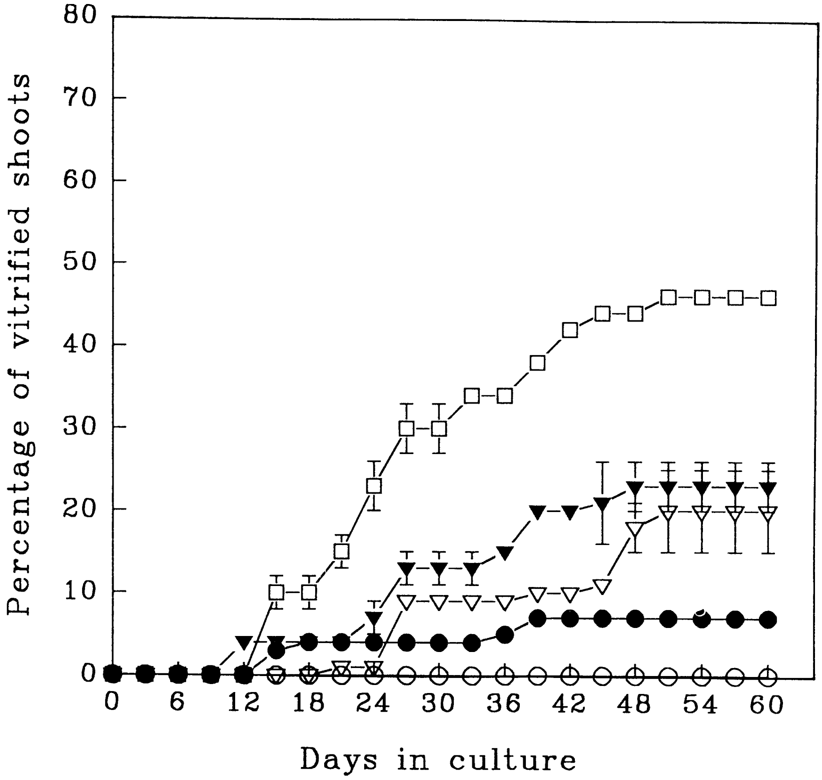

Fig. 2. Percentage of vitrification of carnation cultured in medium with different BA concentrations.

○0 ppm；●0.5 ppm；▽1 ppm；▼2 ppm；□4 ppm

表 2. 不同濃度的 BA 對康乃馨莖頂培養形成枝條的影響

Table 2. Effect of BA concentration on shoot production of carnation shoot tip culture.

Basal medium with BA* (ppm)	No. of explants cultured	Average no. of adventitious shoots produced
0.0	40	2.3[d]**
0.5	40	7.9[c]
1.0	40	8.3[c]
2.0	40	9.6[b]
4.0	40	10.5[a]

* Basal medium : MS basic salts supplemented with 3% sucrose and 0.9% agar, pH=5.7. Culture duration was 30 days. The percentage of vitrified shoots was shown in Fig. 2.
** Same as Table 1.

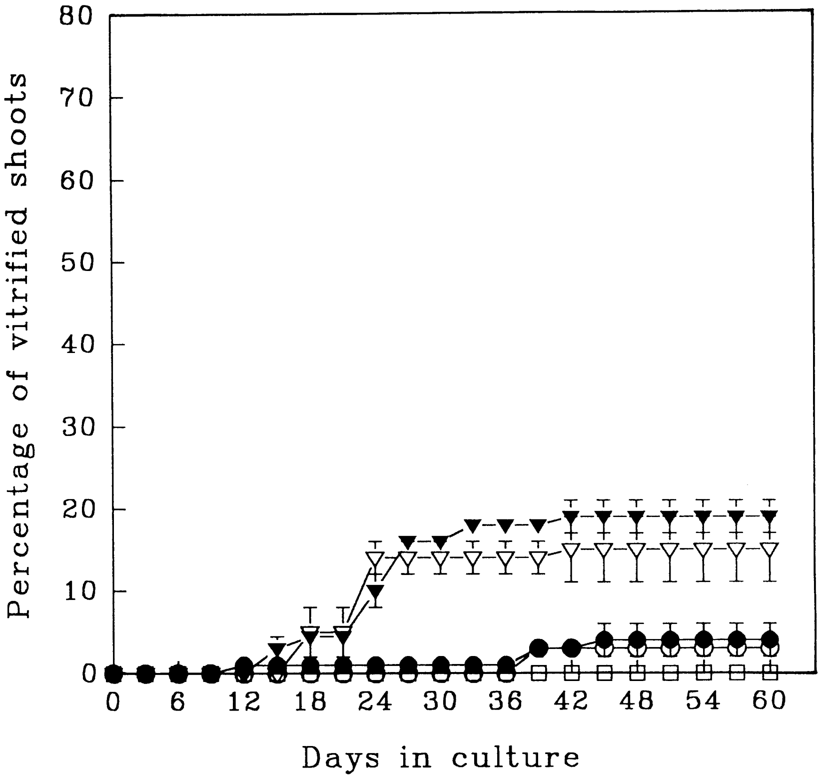

Fig. 3. Percentage of vitrification of carnation cultured in medium with different kinetin concentrations.

□0 ppm ; ○1 ppm ; ●2 ppm ; ▽4 ppm ; ▼8 ppm

表 3. 不同濃度的 kinetin 對康乃馨莖頂培養形成枝條的影響

Table 3. Effect of kinetin concentration on shoot production of carnation shoot tip culture.

Basal medium with kinetin* (ppm)	No. of explants cultured	Average no. of adventitious shoots produced
0.0	40	2.3c**
1.0	40	2.8c
2.0	40	3.8b
4.0	40	5.3a
8.0	40	5.6a

* Basal medium : MS basic salts supplemented with 3% sucrose and 0.9% agar, pH=5.7. Culture duration was 30 days. The percentage of vitrified shoots was shown in Fig. 3.
** Same as Table 1.

三、不同的硝酸態氮對氨態氮比例之影響

在 NO_3^-：NH_4^+的試驗中發現康乃馨培養至第30天時，NO_3^-：NH_4^+=1：2之培養基玻璃質化枝條

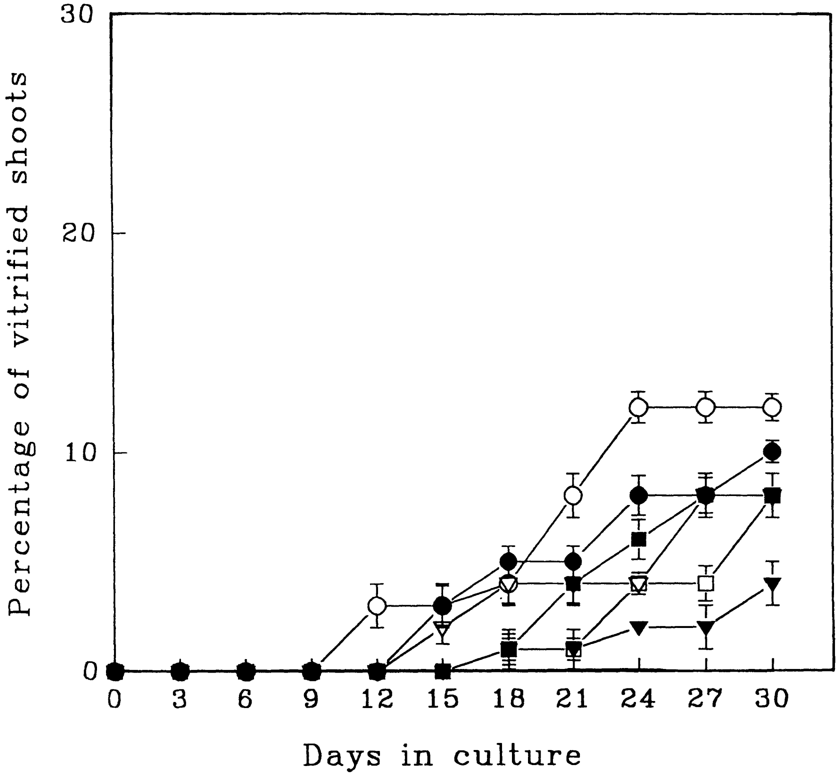

Fig. 4. Percentage of vitrification of carnation cultured in medium with different ratios of NO_3^- : NH_4^+.

■16 : 1 ; □8 : 1 ; ▼4 : 1 ; ▽2 : 1 ; ●1 : 1 ; ○1 : 2

佔12%較嚴重，其餘爲1：1（10%）、2：1（8%）、4：1（4%）、8：1（8%）及16：1（8%）（圖4），顯示含有 NH_4^+離子較多時，其枝條玻璃質化情形較嚴重，但處理間之差異並不明顯。表4則顯示 NO_3^-：NH_4^+＝1：1或2：1之培養基，最有利於康乃馨莖頂培養形成大量枝條，NO_3^-：NH_4^+比例過高則不利於枝條形成。

表4. 不同比例的 NO_3^-：NH_4^+ 對康乃馨莖頂培養形成枝條的影響

Table 4. Effect of NO_3^- : NH_4^+ ratio on shoot production of carnation shoot tip culture.

Basal medium with NO_3^- : NH_4^+*	No. of explants cultured	Average no. of adventitious shoots produced
1 : 2	40	4.6c**
1 : 1	40	8.2a
2 : 1	40	7.9a
4 : 1	40	6.0b
8 : 1	40	5.5b
16 : 1	40	4.9c

* Basal medium : MS basic salts supplemented with 3% sucrose 0.9% agar and 0.5 ppm BA, pH= 5.7. Culture duration was 30 days. The percentage of vitrified shoots was shown in Fig. 4.
** Same as Table 1.

四、玻璃質化枝條之組織切片觀察

玻璃質化枝條之外觀具水浸狀肉質莖葉，而組織切片則顯示其葉部之柵狀組織及海綿組織、莖部之維管束及形成層不如正常葉莖者有明顯之分化，莖部皮層細胞排列較不整齊；葉肉較正常者缺乏柵狀組織及海綿組織之分化，細胞排列亦較不整齊，其間有大且空的細胞（圖5）。

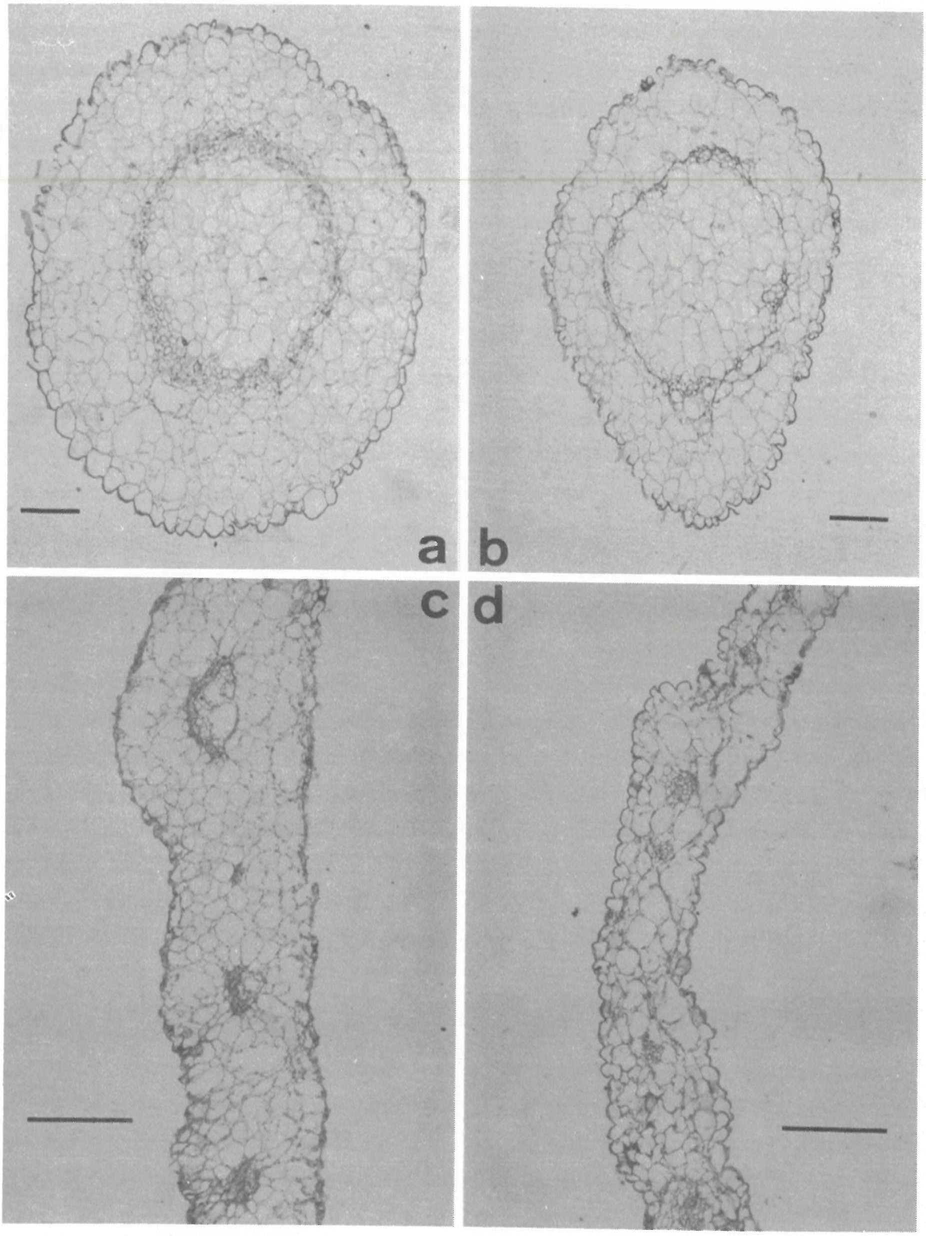

圖5. 康乃馨試管苗之組織切片(a)正常植株莖部橫切面；(b)玻璃質化植株莖部橫切面；(c)正常植株葉部橫切面；(d)玻璃質化植株葉部橫切面。玻璃質化試管苗之特化組織，如維管束及形成層等較正常植株不分化，莖部皮層細胞排列較不整齊；葉肉較正常者缺乏柵狀組織及海綿組織之分化，細胞排列亦較不整齊，其間有大且空的細胞。(bar=200μ)

Fig. 5. Cross section of normal stem (a) and leave (c) and vitrified stem (b) and leave (d) of carnation plantlets. The vitrified stems showed less differentiated tissue, and the cortical and pith parenchyma contained enlarged cells, and leaves were lack of clear differentation between palisade and spongy mesophyll cell. The big and empty cell was predominant in palisade and spongy mesophyll cells. (bar=200μ)

討 論

許多報告對引起玻璃質化的機制提出不同的解釋，Debergh et al.[7]指出基質潛勢（matric potential）爲水分潛勢（water potential）之組成分，由洋菜濃度所控制，爲影響玻璃質化的因子之一，提高洋菜濃度可減少試管苗玻璃質化之形成，其原因可能是因洋菜濃度增加而減低了水分的有效性，阻礙複雜大分子的移動。Paques and Boxus[16]認爲水解的洋菜中，有某種可與 cytokinin 反應的物質，減緩 cytokinin 誘導玻璃質化的特性，且不會抑制芽體生長，在他們的試驗中發現培養於含 BA 培養基之 M26 蘋果試管苗，可藉一種 hydrolized agar（Bacto Difco）extract 的加入而控制玻璃質化，故認爲洋菜之抗玻璃質化（antivitrification）效應，並非因爲造成高培養基基質潛勢（high medium matrix potential）或降低試管內相對濕度之因，而是洋菜含一種可與 BA 作用之化學物質而控制了玻璃質化的現象。本研究亦發現隨著洋菜的濃度增加，康乃馨的玻璃質化枝條比例逐漸減少，但洋菜濃度太高的情況下（1.2%以上），可能因爲培養基中水分及養分的移動受到限制，而使枝條的生育較差（表１）。Leshem[12]發現在瓜類（*Cucumis melo*）的組織培養中，當其他可接受的誘引因子（如含低濃度洋菜的培養基、高相對濕度及高濃度的氨態氮）存在下，若無 cytokinin 的存在則無法誘導出玻璃質化，所以認爲 cytokinin 可稱爲玻璃質化的 "primary factor"。Phan[17]亦發現 BA 的濃度與玻璃質化的程度成正比，以早先關於玻璃質化之試管苗缺乏木質素之報告爲基礎，他假設玻璃質化的起因是由 cytokinin 所造成細胞分裂之不平衡狀況，而導致分化的一種干擾過程，尤其是對木質素的合成……被發現在大多數新細胞中，木質素的合成很難繼續下去。此種由 Phan 所假設「分化的干擾過程」亦可解釋 Ziv[22]最近的發現，玻璃質化之增加與 cellulose 之合成減少或混亂有關，進一步造成細胞壁之硬度減低，且使水的吸收增加、細胞崩解、產生無功能性保衛細胞和角質層之缺乏等現象。McLaughlin and Karnosky[14]亦發現培養基中 cytokinin 濃度之減少，使落葉松屬植物（*Caryx decidua*）的組織培養試管苗，玻璃質化的頻度自70%降至30%，但此過程會造成枝條繁殖率的減少。本研究使用兩種 cytokinin，亦得到和上述相同的結果，顯示 cytokinin 的確是造成康乃馨枝條玻璃質化的主因。在 BA 的試驗中發現隨著 BA 濃度的減少，玻璃質化的枝條比例漸減；而 kinetin 的培養基中也發現，試管苗之玻璃質化情形亦隨著 kinetin 濃度的減少而漸減，但情況不若 BA 嚴重，顯示 kinetin 對康乃馨枝條之玻璃質化影響較 BA 小，然而以康乃馨的大量繁殖而言，BA 促進枝條的生長效果較 kinetin 好，過高的 BA 除造成嚴重的玻璃質化現象外，在本試驗中亦發現枝條有叢生的傾向，反之過低的 BA（少於 0.5 ppm）則枝條較少，且枝條有徒長、莖葉纖細枯黃及生育較差的現象，0ppm kinetin（對照組）亦有相同的情形，所以爲避免枝條之玻璃質化，而又能使枝條生育良好，應在二者之間找到一個平衡點，本研究顯示含有 0.5ppm BA 之 cytokinin 較適合康乃馨枝條培養之大量繁殖（表２及表３）。

在無機養份對玻璃質化的影響中，將 MS 基本培養基中氮源（NO_3^-及NH_4^+）的濃度降爲原來的1/2或1/3，可使 *Salix babylonica*[3]及 *Prunus avium*[19]二者之玻璃質化的比率均降低，Beauchesne[3]發現，利用含氨態氮較少之 Knop's 基本培養基，可得到大量木質化良好的幼苗，相似的結果亦見於 Letouze and Daguin[13]之報告，故有人認爲組織培養的繁殖體，若自培養基吸收過量的氮易使體內 C/N ratio 降低，而導致木質素及纖維素的合成缺乏，進而產生玻璃質化的症狀。本研究發現，氨態氮比例過多，枝條玻璃質化情形較嚴重，但趨勢並不十分明顯。對康乃馨的大量繁殖而言，1：1～2：1的 NO_3^-：NH_4^+ 對於枝條的生長較爲適合（表4）。初步試驗證實經多次繼代培養後之枝條較易玻璃質化，是否繼代培養亦扮演相當的角色，值得進一步研究。

玻璃質化的枝條，具玻璃狀的外表、水浸狀及半透明狀肉質莖葉，其葉中水份增加、蛋白質及葉綠體的成份減少[9,18,23]。在解剖上，玻璃質化枝條莖部之維管束及形成層不如正常莖者有明顯之分化

，莖部皮層細胞變大、數目增加，尤其深層皮層之薄壁細胞腫大更爲明顯，其間並出現許多細胞間隙。葉片主要特徵是其柵狀組織及海綿組織無明顯的分化，亦具許多細胞間隙，其葉肉細胞較正常者厚，尤以下位葉更爲明顯，靠近或接觸培養基的葉片薄壁細胞增殖成 8 —10層（正常者爲 4 — 5 層），而此增厚部份主因葉肉細胞增殖的結果，並非細胞間隙增加的結果[20]，Leshem[11]形容玻璃質化之康乃馨，具肉質多汁的分生組織，其中具大且空的細胞，缺乏原形成層束。本研究所發生之玻璃質化枝條，切片觀察得知其葉部之柵狀組織及海綿組織、莖部之維管束及形成層不如正常葉莖者有明顯之分化，莖部皮層細胞排列較不整齊；葉肉較正常者缺乏柵狀組織及海綿組織之分化，細胞排列亦較不整齊，其間有大且空的細胞。

引用文獻

1. 蔡新聲。1978。不同氮素營量生長下菸草花葯的培養與單倍體形成之研究。國立臺灣大學農藝研究所博士論文。臺北市。
2. 蔡淑華。1990。植物組織切片技術綱要。43—44頁。茂昌圖書有限公司。臺北市。
3. Beauchesne, G. 1981. Les milileux mineraux utilises en culture in vitro et leur incidence sur papparition de boutures d'aspect pathologique. C. R. Acad. Agric. Paris 67 : 1389—1397.
4. Bornman, C. H. and T. C. Vogelmann. 1984. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine induced adventitious bud formation and vitrification in vitro in *Picea abies*. Physiol. Plant. 61 : 505—512.
5. Cachita-Cosma, D 1989. Carnation vitrification. Agricell Report 13 : 6.
6. Debergh, P. C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol. Plant. 59 : 270—276.
7. Debergh, P. C., Y. Harbaoui, and R. Lemeur. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) : evaluation of different hypothesis of overcome vitrification with special reference to water potential. Physiol. Plant. 53 : 181—187.
8. Earle, E. D. and R. W. Langhans. 1975. Carnation propagation from shoot tips cultured in liquid medium. HortScience 10 : 608—610.
9. Kever, C., M. Coumans, M. F. Coumans-Gilles, and T. Gaspar. 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. Physiol. Plant. 61 : 69—74.
10. Kever, C. and T. Gaspar. 1986. Vitrification of carnation in vitro : change in water content, extracellular space, air volume and ion levels. Physiol. Veg. 24 : 647—653.
11. Leshem, B. 1983. Growth of carnation meristems in vitro. Anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation. Ann. Bot. 52 : 413—415.
12. Leshem, B. 1988. Cytokinin : The primary inducer of vitrification. Agricell Report 10 : 46.
13. Letouze, R. and F. Daguin. 1983. Manifestation spontanee et aleto rie d'une croissance anormale en culture in vitro. Recherchede marqueurs metaboliques. Rev. Can. Biol. Exp. 42 : 23—28.
14. McLaughlin, J. and D. F. Karnosky. 1988. Cytokinin : The primary inducer of vitrification. Agricell Report 10 : 46.
15. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473—497.
16. Paques. M. and P. H. Boxus. 1984. Comparative studies of vitreous and non-vitreous plantlets of apple rootstock M-26 cultivated in vitro. Abstr. 4th Congt. FESPP, pp. 282—283, Strasbourgh, France.
17. Phan, C. T. 1991. Vitrifiication : cause and prevention. Agricell Report 16 : 21.
18. Phan, C. T. and R. Letouze. 1983. A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and of hydroxycinnamate : CoA-ligase activity of normal and 'vitreous' plants (*Prunus avium* L.) obtained in vitro. Plant Sci. Lett. 31 : 323—327.

19. Riffaud, J. L. and D. Cornu. 1981. Utilisation de la culture in vitro pour la multiplication de merisiers adultes (*Prunus avium* L.) selectionnes en foret. Agronomie 1：633—640.

20. Vieitez, A. M., A. Ballester, M. C. San-Jose, and E. Vieitez. 1985. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated in vitro. Physiol. Plant. 65：177—184.

21. von Arnold, S. V. and T. Eriksson. 1984. Effect of concentration of agar on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* (L.) . Plant Cell Tissue Organ Culture 3：257—264.

22. Ziv, M. 1990. Transition of plants from in vitro cultures to establishment in vivo. Agricell Report 15：3.

23. Ziv, M., G. Meir. and A. H. Halevy. 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plentlets in vitro. Plant Cell Tissue Organ Culture 2：55—65.

Effects of Medium Composition on the Vitrification of Carnation Plantlets Cultured In Vitro[1]

Hsin-Mei Ku and Hsin-Sheng Tsay[2]

Summary

Vitrification of carnation plantlets cultured in vitro is characterized by the appearance of water-soaked translucent stem and leaves. It is detrimental to the successful transplanting of these plantlets to the field. The purpose of this study was to evaluate medium composition for the percentage and degree of vitrification in carnation plantlets derived from shoot-tip culture. The percentage of plantlets vitrification was significantly higher in liquid culture than in solid-medium culture. Comparison between the effects of gelling agents showed that Gelrite-containing medium produced severer vitrification than Difco agar-containing medium. The degree of vitrification decreased with increasing concentration of Difco agar in the medium. The addition of cytokinins, either benzyladenine (BA) or 6-furfurylaminopurine (kinetin), increased markedly the percentage of vitrified plants. The effect was more pronounced at high cytokinin concentrations. BA-containing medium produced more serious vitrification than kinetin-containing medium. Higher ratios of NO_3^- to NH_4^+ in the medium could prevent the vitrification of carnation plantlets. Ratios of 1-2 resulted in the highest number of adventitious shoots. In conclusion, the medium containing 1/2 MS basic salts supplemented with 3% sucrose, 0.9% agar, and 0.5 ppm BA (pH 5.7±0.1) was ideal for both mass propagation and reduced vitrification of carnation plantlets. Cytohistological examinations revealed that the leaves of vitrified plants were lack of clear differentiation between palisade and spongy mesophyll cells. The large and empty cells were predominant in palisade and spongy mesophyll. The stems showed less differentiated tissue and the cortical and pith parenchyma contained enlarged cells as compared to the stems of normal plantlets.

Key words : Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), Tissue culture, Vitrification, Cytohistological examination.

1. Contribution No. 1705 from Taiwan Agricultural Research Institute.
2. Respectively, Research assistant and Senior agronomist, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.